

New pro sequence for secretion of heterologous proteins from yeast cells:

Patent Number: EP0607080
Publication date: 1994-07-20
Inventor(s): ACHSTETTER TILMAN (DE)
Applicant(s): TRANSGENE SA (FR)
Requested Patent: ☐ EP0607080
Application Number: EP19940400062 19940111
Priority Number(s): FR19930000171 19930111
IPC Classification: C12N15/81 ; C12N15/62 ; C12N15/15 ; C12N15/20 ; C12N15/12 ; C12N1/15 ; C07K13/00
EC Classification: C12N15/81, C07K14/435A4D, C07K14/46, C07K14/56, C07K14/815
Equivalents: ☐ FR2700338

Abstract

The present invention relates to a new pro sequence which permits the synthesis and secretion of heterologous proteins from a yeast cell, more particularly a yeast of the genus *Saccharomyces cerevisiae*. The new pro sequence is derived from the *Phormia terranova* insect defensin A precursor. The present invention relates to an expression cassette, a vector as well as a yeast cell comprising a DNA fragment encoding the said pro sequence and a process for preparing heterologous proteins using such a pro sequence.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

La présente invention a trait à une nouvelle séquence pro capable de promouvoir la maturation de pré-curseurs de protéines hétérologues et la sécrétion desdites protéines hétérologues, à partir d'une cellule de levure recombinante. La nouvelle séquence pro est dérivée du précurseur de la défensine A d'insecte. L'invention concerne plus particulièrement une cassette d'expression, un vecteur ainsi qu'une cellule de levure contenant un fragment d'ADN codant pour ladite séquence pro et un procédé de préparation de protéines hétérologues mettant en oeuvre une telle séquence. La présente invention est particulièrement destinée à la production par la levure, notamment une levure du genre *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), de protéines hétérologues présentant un intérêt industriel, qui seront secrétées dans le milieu de culture des levures dans lequel elles pourront être récupérées.

Les levures sont des organismes eucaryotes unicellulaires. Depuis déjà de nombreuses années, les levures et plus particulièrement les levures du genre *S. cerevisiae*, sont couramment utilisées pour la production de protéines d'intérêt industriel. En effet, la génétique et la biochimie de cette souche ont été étudiées intensivement en laboratoire.

Leur intérêt à titre de cellules hôte repose sur le fait qu'il s'agit d'organismes se multipliant rapidement dans des milieux non coûteux et dont la génétique peut être facilement manipulée en utilisant les techniques de l'ADN recombinant.

On a établi que la levure est capable de sécréter quelques protéines dans le milieu externe. D'une manière générale, le processus de sécrétion est un processus complexe, qui nécessite le passage de la protéine à sécréter, du cytoplasme dans le réticulum endoplasmique pour, en bout de course, être secrétée dans le milieu externe.

D'une manière générale, les protéines sécrétables sont exprimées sous la forme d'un précurseur contenant une séquence signal amino-terminale. De nombreux précurseurs de protéines secrétées et de protéines membranaires ont été décrits dans la littérature, tant chez les procaryotes que chez les eucaryotes.

D'une manière générale, une séquence signal contient un grand nombre de résidus d'acides aminés hydrophobes. Sa fonction est de promouvoir le passage d'un précurseur d'une protéine devant être secrétée, dans le réticulum endoplasmique. Au cours de cette étape de la sécrétion, la séquence signal est clivée par une endopeptidase associée à la membrane, encore appelée signal peptidase, pour donner la protéine mature.

Ainsi, pour qu'une protéine hétérologue soit secrétée dans la levure, elle doit être précédée d'une séquence signal, encore appelée séquence pré, reconnue par la levure. En général, on utilise une séquence signal homologue, issue d'une protéine sécrétable de la levure, qui va diriger la sécrétion de la protéine de fusion, séquence signal homologue-protéine hétérologue mature.

En outre, la sécrétion peut nécessiter la présence additionnelle d'une séquence dans le précurseur de la protéine destinée à être secrétée, cette séquence supplémentaire étant appelée séquence pro. Ainsi, la protéine à sécréter est exprimée sous la forme d'un précurseur pré-pro-protéine. De nombreuses protéines de levure naturellement secrétées contiennent, outre la séquence pré, une séquence pro.

Ainsi, le facteur α ($MF\alpha$) qui dérive du gène $MF\alpha 1$, est une phéromone sexuelle secrétée par les cellules haploïdes de *S. cerevisiae* de type $MAT\alpha$. Le facteur $MF\alpha 1$ est initialement synthétisé sous la forme d'un précurseur pré-pro-facteur α . Ledit précurseur consiste en une séquence signal ou séquence pré de 19 acides aminés, suivie d'une séquence pro de 64 acides aminés contenant trois sites de glycosylation, elle-même suivie d'une séquence Lys-Arg précédant 4 copies du facteur α séparées par des peptides espaceurs contenant entre autre le dipeptide Lys-Arg (Kurjan et Herskowitz, Cell, 1982, 30, 933-943).

Il est connu que le système endogène de sécrétion de la levure peut être mis en oeuvre pour permettre la sécrétion de protéines hétérologues mature dans le milieu de culture. C'est un système particulièrement avantageux d'un point de vue industriel, puisque la protéine hétérologue peut être récupérée directement du milieu de culture, évitant ainsi les étapes de broyage ou de cassage des cellules difficiles à maîtriser et éliminant les risques de dégradation intracellulaire dus aux nombreuses protéases contenues dans une levure.

Ainsi, de nombreuses publications relatent l'utilisation des séquences pré et pro du facteur α codées par le gène $MF\alpha 1$ (pré $MF\alpha 1$, pro $MF\alpha 1$), pour produire un grand nombre de protéines étrangères à la levure, par exemple l'hirudine. L'hirudine est un inhibiteur très spécifique et efficace de la thrombine. Il s'agit donc d'un agent thérapeutique très intéressant présentant une activité anticoagulante. Un certain nombre de variants de l'hirudine ont été identifiés et produits dans des souches de *S. cerevisiae*, en utilisant le procédé de sécrétion mettant en oeuvre les séquences pré et pro $MF\alpha 1$, comme cela est décrit dans les demandes EPA 0252854 et EPA 0273800 au nom de la demanderesse.

D'autre part, Dimarcq et al. (EMBO J., 1990, 9, 2507-2515) ont récemment mis en évidence que les larves d'insecte *Phormia terranova*, dans lesquelles ont été injectées des bactéries, produisent et secrètent dans le sang un produit bactéricide anti gram+, encore appelé défensine A. Ces auteurs ont publié la séquence d'un ADN complémentaire (ADNc) codant pour un précurseur de la défensine A. Le précurseur est constitué de 94 acides aminés, dont les 40 acides aminés C-terminaux correspondent à la défensine A mature. La séquence



Europäische Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Numéro de publication : **0 607 080 A1**

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt : **94400062.9**

(22) Date de dépôt : **11.01.94**

(51) Int. Cl.⁵ : **C12N 15/81, C12N 15/62, C12N 15/15, C12N 15/20, C12N 15/12, C12N 1/15, C07K 13/00, // (C12N1/15, C12R1:865), (C12N1/15, C12R1:84), (C12N1/15, C12R1:78)**

(30) Priorité : **11.01.93 FR 9300171**

(43) Date de publication de la demande :
20.07.94 Bulletin 94/29

(84) Etats contractants désignés :
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

(71) Demandeur : **TRANSGENE S.A.**
11, rue de Molsheim
F-67000 Strasbourg (FR)

(72) Inventeur : **Achstetter, Tilman**
Uhlandweg 11
D-00760 Oberkirch (DE)

(74) Mandataire : **Warcoin, Jacques**
Cabinet Régimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris (FR)

(54) **Nouvelle séquence pro permettant la sécrétion de protéines hétérologues à partir d'une cellule de levure.**

(57) La présente invention concerne une nouvelle séquence pro permettant la synthèse et la sécrétion de protéines hétérologues à partir d'une cellule de levure, plus particulièrement une levure du genre *Saccharomyces cerevisiae*. La nouvelle séquence pro est dérivée du précurseur de la défensine A d'insecte *Phormia terranova*. La présente invention concerne une cassette d'expression, un vecteur ainsi qu'une cellule de levure comprenant un fragment d'ADN codant pour ladite séquence pro et un procédé de préparation de protéines hétérologue mettant en oeuvre une telle séquence pro.

EP 0 607 080 A1

Jouve, 18, rue Saint-Denis, 75001 PARIS

pré comprend les 23 ou 28 premiers acides aminés N-terminaux et montre toutes les caractéristiques d'une séquence signal (nature hydrophobe et présence d'un site potentiel de clivage par une signal peptidase après l'alanine en position 23 ou l'alanine en position 28). La séquence pré est suivie d'une séquence pro de 31 ou 26 acides aminés, selon la longueur de la séquence pré, qui se termine par un dipeptide basique Lys-Arg.

On a maintenant trouvé que la séquence pro du précurseur de la défensine A peut être utilisée pour sécréter efficacement des protéines hétérologues dans la levure, notamment dans la levure du genre *S. cerevisiae*.

L'utilisation de ladite séquence pro de défensine A est notamment utile pour produire dans la levure des protéines hétérologues présentant un intérêt industriel, comme par exemple l'hirudine ou la trophoblastine d'ovin contenant, en outre, une extension N-terminale constituée par le dipeptide Ala-Pro, ladite extension n'ayant aucun effet sur l'activité biologique du produit (Degryse et al., Gene, 1992, 118, 47-53).

La présente invention a donc pour objet une cassette d'expression permettant la synthèse d'une protéine hétérologue mature, comprenant au moins un fragment d'ADN codant pour un précurseur de ladite protéine hétérologue ; ledit précurseur comprenant :

- une séquence pré fonctionnelle dans la levure,
- la séquence pro du précurseur de la défensine A de *Phormia terranova*, un variant ou un fragment fonctionnel de celle-ci, et
- une séquence correspondant à celle de ladite protéine hétérologue sous forme mature ;

ledit fragment d'ADN étant sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression.

Par protéine hétérologue, on entend toute protéine qui n'est pas produite naturellement par la levure, ainsi que toute protéine qui n'est pas produite naturellement par *Phormia terranova*.

Les protéines hétérologues matures qui peuvent être synthétisées dans un tel système peuvent être constituées par toute protéine hétérologue mature native. Cependant d'une manière alternative, une protéine hétérologue mature peut être constituée par la fusion de deux ou plusieurs polypeptides d'intérêt, d'origine diverse ou par une protéine hétérologue mutée par rapport à la protéine hétérologue native, de manière à présenter une activité biologique améliorée ou modifiée.

A titre d'exemple, on cite l'hirudine, notamment son variant rHV2-Lys⁴⁷, la trophoblastine ovine comprenant une extension N-terminale constituée par le dipeptide Ala-Pro ainsi que les xénokines, famille de peptides isolés de *Xenopus laevis* (Kolbe et al., J. of Biol. Chem., 1993, 268, 16458-16464).

Par séquence pré, on entend une séquence pré principalement hydrophobe en nature, présente à l'extrémité N-terminale de la forme précurseur d'une protéine destinée à être sécrétée et dont la fonction est de permettre au précurseur de ladite protéine d'entrer dans le chemin de sécrétion, en particulier dans le réticulum endoplasmique, d'une cellule de levure. La séquence pré est normalement clivée au cours du processus de sécrétion par une signal peptidase endogène.

La séquence pré peut être naturelle ou synthétique, hétérologue ou homologue à la levure, peut être constituée par un variant d'une séquence pré naturelle ou par un fragment fonctionnel de celle-ci. Par fragment fonctionnel, on entend tout fragment d'une séquence pré naturelle capable d'assurer l'entrée d'un précurseur d'une protéine sécrétable dans le chemin de sécrétion d'une cellule de levure. De préférence, on utilisera un fragment d'ADN codant pour un précurseur dont la séquence pré est une séquence pré homologue à la levure, par exemple la séquence pré du précurseur du facteur α (MF α 1), de l'invertase ou de la β -glucanase 2 (BGL2) de *S. cerevisiae*.

Une séquence pro du précurseur codé par le fragment d'ADN utilisé dans la cassette d'expression selon l'invention, peut avoir notamment une séquence telle que montrée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO:1, débutant à l'acide aminé en position +1 ou +6 et se terminant à l'acide aminé +31, dans laquelle, ensemble ou séparément, le résidu Xaa en position +2 est un résidu proline ou cystéine, le résidu Xaa en position +6 est un résidu alanine ou cystéine, le résidu Xaa en position +9 est un résidu alanine cystéine ou thréonine, le résidu Xaa en position +17 est un résidu alanine ou cystéine, le résidu Xaa en position +28 est un résidu arginine ou proline et le résidu Xaa en position +30 est un résidu arginine ou lysine.

On préfère notamment mettre en oeuvre la séquence pro native du précurseur de la défensine A de *Phormia terranova*, telle que montrée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2.

Un variant de la séquence pro, peut comporter plusieurs mutations par rapport à la séquence pro native du précurseur de la défensine A de *Phormia terranova*, notamment la substitution, l'addition ou la délétion d'un ou plusieurs acides aminés, à la condition qu'un tel variant soit capable de diriger un précurseur d'une protéine hétérologue sécrétable du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi puis de permettre la sécrétion de ladite protéine hétérologue dans le milieu de culture d'une cellule de levure. On cite plus particulièrement les variants comprenant un résidu cystéine aux positions +2, +6, +9 ou +17 et/ou un résidu proline en position +29.

De manière plus particulière, une séquence pro a notamment une séquence dont le degré d'homologie

avec la séquence pro native du précurseur de la défensine A de *Phormia terranova* est supérieur à 80%, de manière avantageuse supérieur à 90% et de préférence supérieur à 95%.

Au cours du processus de sécrétion, la séquence pro est clivée par une endoprotéase, laquelle reconnaît à l'extrémité 3' de ladite séquence pro, une séquence cible constituée par un dipeptide basique de type Lys-Arg ou Arg-Arg et clive après ladite séquence cible, libérant ainsi la protéine hétérologue mature. L'endoprotéase peut être homologue ou hétérologue à la levure, peut être constituée par un variant ou un fragment fonctionnel de celle-ci. Par endoprotéase, on entend toute endoprotéase capable de reconnaître et cliver après une séquence cible située à l'extrémité 3' de ladite séquence pro, notamment après un dipeptide basique Lys-Arg ou Arg-Arg. On peut citer, par exemple, le produit de tout ou partie du gène KEX2 de *S. cerevisiae* ou une endoprotéase hétérologue exprimée dans la cellule de levure, comme la furine des cellules de mammifères.

Ainsi la séquence pro comporte à son extrémité 3' un dipeptide basique Lys-Arg ou Arg-Arg permettant de cliver la séquence pro de la protéine à sécréter probablement dans l'appareil de Golgi, libérant ainsi la forme mature de ladite protéine.

Selon un mode préféré, la séquence pro a la séquence en acides aminés telle que montrée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO:1, débutant à l'acide aminé en position +1 ou +6 et se terminant à l'acide aminé +31, dans laquelle le résidu Xaa en position +2 est un résidu proline, le résidu Xaa en position +6 est un résidu alanine, le résidu Xaa en position +9 est un résidu alanine ou thréonine, le résidu Xaa en position +17 est un résidu alanine, le résidu Xaa en position +28 est un résidu arginine et le résidu Xaa en position +30 est un résidu arginine ou lysine.

Ainsi, la séquence pro est avantageusement choisie parmi :

(1) la séquence pro du précurseur de la défensine A de *Phormia terranova*, débutant à l'acide aminé en position +1 et se terminant à l'acide aminé +31, dans laquelle le résidu Xaa en position +9 est un résidu alanine et le résidu Xaa en position +30 est un résidu arginine.

(2) la séquence pro du précurseur de la défensine A de *Phormia terranova*, débutant à l'acide aminé en position +1 et se terminant à l'acide aminé +31, dans laquelle le résidu Xaa en position +9 est un résidu thréonine et le résidu Xaa en position +30 est un résidu arginine.

(3) la séquence pro du précurseur de la défensine A de *Phormia terranova*, débutant à l'acide aminé en position +1 et se terminant à l'acide aminé +31, dans laquelle le résidu Xaa en position +9 est un résidu alanine et le résidu Xaa en position +30 est un résidu lysine.

(4) la séquence pro du précurseur de la défensine A de *Phormia terranova*, débutant à l'acide aminé en position +1 et se terminant à l'acide aminé +31, dans laquelle le résidu Xaa en position +9 est un résidu thréonine et le résidu Xaa en position +30 est un résidu lysine.

(5) la séquence pro du précurseur de la défensine A de *Phormia terranova*, débutant à l'acide aminé en position +6 et se terminant à l'acide aminé +31, dans laquelle le résidu Xaa en position +9 est un résidu alanine et le résidu Xaa en position +30 est un résidu arginine.

(6) la séquence pro du précurseur de la défensine A de *Phormia terranova*, débutant à l'acide aminé en position +6 et se terminant à l'acide aminé +31, dans laquelle le résidu Xaa en position +9 est un résidu thréonine et le résidu Xaa en position +30 est un résidu arginine.

(7) la séquence pro du précurseur de la défensine A de *Phormia terranova*, débutant à l'acide aminé en position +6 et se terminant à l'acide aminé +31, dans laquelle le résidu Xaa en position +9 est un résidu alanine et le résidu Xaa en position +30 est un résidu lysine.

(8) la séquence pro du précurseur de la défensine A de *Phormia terranova*, débutant à l'acide aminé en position +6 et se terminant à l'acide aminé +31, dans laquelle le résidu Xaa en position +9 est un résidu thréonine et le résidu Xaa en position +30 est un résidu lysine.

Par éléments nécessaires à l'expression du fragment d'ADN codant pour un précurseur d'une protéine hétérologue, on entend l'ensemble des éléments permettant la transcription dudit fragment d'ADN en ARN messager (ARNm) et la traduction de l'ARNm en protéine.

La cassette d'expression selon l'invention, comporte notamment un promoteur fonctionnel dans une cellule de levure. De tels promoteurs sont bien connus de l'homme de l'art et sont insérés dans la cassette d'expression en amont du fragment d'ADN à transcrire, par les techniques conventionnelles du génie génétique. On citera, par exemple, les promoteurs du gène PGK (phosphoglycérate kinase), du gène MF β 1 et du gène ADH (alcool-déshydrogénase) de levure.

Une cassette d'expression selon l'invention, présentant un intérêt particulier, est celle qui associe un fragment d'ADN codant pour un précurseur de l'hirudine, comportant la séquence pré du précurseur du facteur α de la levure, la séquence pro du précurseur de la défensine A de *Phormia terranova*, débutant à l'acide aminé en position +1 et se terminant à l'acide aminé +31, dans laquelle le résidu Xaa en position +9 est un résidu alanine et le résidu Xaa en position +30 est un résidu lysine et la séquence correspondant à celle du variant rHV2-Lys⁴⁷ de l'hirudine, ledit fragment d'ADN étant sous le contrôle du promoteur du gène MF α 1 de la levure.

Enfin, la cassette d'expression selon l'invention peut comprendre, en outre, un terminateur de transcription fonctionnel dans la levure, par exemple, une séquence de terminateur du gène PGK.

La cassette d'expression selon l'invention peut être insérée dans un vecteur d'expression qui sert à transformer une cellule de levure hôte. Les vecteurs d'expression selon l'invention, seront en général des plasmides à replication autonome. Ces plasmides peuvent comporter des éléments assurant leur replication, c'est à dire une origine de replication, telle que celle du plasmide 2 μ de levure et des éléments de sélection, tel le gène *ura3* ou *leu2* qui assure la complémentation des mutants de levure *ura3* ou *leu2*. En particulier, on pourra avantageusement utiliser un gène de sélection délété de son promoteur afin d'augmenter le nombre de copies de plasmides dans une cellule de levure.

Ces plasmides peuvent également comporter des éléments assurant leur replication dans *Escherichia coli* (*E. coli*), lorsque le plasmide doit être un plasmide navette, par exemple, une origine de replication telle que celle du plasmide pBR322, un gène marqueur tel que le gène de la β lactamase conférant la résistance à l'ampicilline et/ou d'autres éléments connus de l'homme du métier.

De manière préférée, le vecteur d'expression selon l'invention comprend, en outre, une ou plusieurs copies de tout ou partie du gène KEX2 menant à une augmentation de l'activité protéolytique de l'endoprotéase yscF. Le gène complet pourvu de son propre promoteur peut être utilisé ainsi que des fragments de ce gène, comme cela est décrit dans la demande EPA 396436 au nom de la demanderesse.

L'invention s'étend également à une souche de levure transformée avec un vecteur d'expression selon l'invention ou comprenant une cassette d'expression selon l'invention intégrée dans son génome. Parmi toutes les souches de levure envisageables, on peut citer les levures *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris* et *Kluyveromyces lactis*. Cependant, on utilisera de préférence les souches du genre *Saccharomyces*, notamment de l'espèce *cerevisiae*. On utilisera, par exemple, une souche de génotype *ura3* ou *leu2* ou autre qui pourra être complétement par le vecteur selon l'invention, pour assurer le maintien du vecteur dans la levure par une pression de sélection appropriée. On pourra également utiliser une souche surproductrice de l'endoprotéase yscF comprenant dans son génome une ou plusieurs copies de tout ou partie du gène KEX2.

L'invention a également trait à un procédé de préparation par des levures d'une protéine hétérologue mature, selon lequel on cultive la souche de levure selon l'invention dans un milieu de culture approprié et on récupère la protéine hétérologue mature secrétée dans le milieu de culture.

Enfin l'invention a pour objet une protéine hétérologue mature obtenue par la mise en oeuvre d'un procédé selon l'invention.

Les exemples ci-après permettront de mettre en évidence d'autres caractéristiques et avantages de la présente invention. Ces exemples seront illustrés par les figures suivantes.

La Figure 1 représente la reconstitution du gène synthétique de la défensine A d'insecte par assemblage de 9 oligonucléotides.

La Figure 2 représente le profil de chromatographie obtenu après analyse par HPLC analytique en phase réverse, des surnageants de culture de A: la souche de *S. cerevisiae* TGY47.1 transformée par pTG6823 ; et B: la souche de *S. cerevisiae* TGY47.1 transformée par pTG6824.

La Figure 3 représente le profil de chromatographie obtenu après analyse par HPLC analytique en phase réverse, des surnageants de culture de A: la souche de *S. cerevisiae* TGY47.1 transformée par pTG8835 ; et B: la souche de *S. cerevisiae* TGY47.1 transformée par pTG8836.

La Figure 4 montre la séparation sur gel SDS-PAGE 12,5% des échantillons issus des cultures de 2 : la souche *S. cerevisiae* TGY47.1 non transformée ; 3: la souche *S. cerevisiae* TGY47.1 transformée par le plasmide pTG8840 ; et 4 : la souche *S. cerevisiae* TGY47.1 transformée par le plasmide pTG8843. La ligne 1 correspond aux protéines marqueur, dont le poids moléculaire en kDA est indiqué sur le côté gauche de la Figure. Le gel est coloré au bleu de Coomassie.

EXEMPLE 1: construction des vecteurs pTG6823 et pTG6824 et production de rHV2-Lys⁴⁷ dans le milieu de culture par une souche de levure transformée par lesdits vecteurs.

Le gène synthétique de la défensine A de *Phormia terranova* est reconstitué en assemblant 9 oligonucléotides, comme indiqué dans la Figure 1.

La partie 5' du gène de la défensine A, à laquelle ont été rajoutés 15 nucléotides codant pour les 5 acides aminés C-terminaux de la séquence pro MF α 1 de levure (Ser-Leu-Asp-Lys-Arg) dont le codon codant pour la sérine a été modifié pour générer en 5' un site *HindIII*, dérive de l'assemblage de trois oligonucléotides décrits dans les SEQ ID NO: 3, 4 et 5 (bloc A sur la Figure 1).

La partie 3' du gène de la défensine A d'insecte est obtenue par l'assemblage de six oligonucléotides décrits dans les SEQ ID NO: 6 à 11 (bloc B sur la Figure 1). Les oligonucléotides réassemblés sont introduits

entre les sites *KpnI* et *EcoRI* du phage M13TG131 (Kieny et al., Gene, 1983, 26, 91-99). La partie 5' est ensuite insérée entre les sites *HindIII* et *KpnI* du vecteur phagique précédant, générant ainsi le phage M13TG3849 contenant le gène complet de la défensine A d'insecte

Le fragment *HindIII*-*BamHI* comprenant la séquence codant pour la Ser-Leu-Asp-Lys-Arg-défensine A est isolé de M13TG3849. Parallèlement, un fragment *SphI*-*HindIII* est purifié de M13TG3868. Le phage M13TG3868 contient la séquence codant pour une protéine de fusion composée de la séquence pré et la séquence pro MF α 1 se terminant par le dipeptide Lys-Arg, suivie de la séquence correspondant à celle du variant rHV2-Lys⁴⁷ de l'hirudine, placée sous le contrôle du promoteur du gène de levure MF α 1. On peut signaler que la séquence pro MF α 1 contient un site artificiel *HindIII* au niveau du codon codant pour la sérine située 5 acides aminés avant l'extrémité C terminale de ladite séquence pro. De plus, le promoteur inclu dans M13TG3868 est une version modifiée du promoteur du gène MF α 1 (Inokuchi et al., Mol. Cell. Biol., 1987, 7, 3185-3193). En effet, le promoteur est modifié par le remplacement du site *EcoRI* 5' par un site *SphI* et par la destruction du site *BglII* interne par un traitement au grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli*. Le fragment *SphI*-*HindIII* de M13TG3868 contient donc la séquence correspondant à la protéine de fusion suivante: séquence pré MF α 1, séquence pro MF α 1 dépourvue des 5 acides aminés C-terminaux Ser-Leu-Asp-Lys-Arg, le tout étant sous le contrôle du promoteur modifié du gène MF α 1.

Les deux fragments sont purifiés sur gel et liés au vecteur M13mp18 (Gibco BRL) dans lequel le site unique *HindIII* est détruit par un traitement au grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli*. On transforme le mélange de ligation dans la souche *E. coli* NM522 et on identifie par digestion enzymatique un clone comprenant le promoteur modifié du gène MF α 1 en amont de la séquence pré MF α 1, de la séquence pro MF α 1 se terminant par le dipeptide Lys-Arg suivie de la séquence synthétique codant pour la défensine A de *Phormia terranova*. Ledit clone est désigné M13TG4813.

Le vecteur M13TG4813 est soumis à une mutagenèse dirigée mettant en oeuvre l'oligonucléotide décrit dans la SEQ ID NO: 12, afin d'introduire un site *NheI* dans la partie 3' de la séquence codant pour le peptide pré MF α 1. Le phage ainsi modifié constitue le M13TG5879.

On isole un fragment *SphI*-*BamHI* de M13TG5879, ledit fragment contenant un bloc d'expression constitué du promoteur modifié du gène MF α 1, et de la séquence codant pour une protéine de fusion comprenant la séquence pré MF α 1, la séquence pro MF α 1 et la séquence de la défensine A mature. On introduit le fragment purifié entre les sites *SphI* et *BamHI* du plasmide pTG3828 (Achstetter et al., Gene, 1992, 110, 25-31). On transforme le mélange de ligation dans la souche *E. coli* 1106. On isole un clone présentant la cartographie de restriction attendue qui est appelé pTG5896. Ainsi, le bloc d'expression décrit ci-dessus est introduit dans un vecteur d'expression de la levure.

Le vecteur M13JM212 est un vecteur dérivé de M13mp18 comprenant la séquence ADNc naturelle codant pour la défensine A et une extension de 65 pb (Dimarcq et al., EMBO J., 1990, 9, 2507-2515). A son extrémité 3', l'insert ADNc contient environ 60pb correspondant à la région non codante de l'ARNm de la défensine A. De plus, l'insert ADNc est muni à ses deux extrémités de linkers *EcoRI*. Le vecteur M13JM212 est soumis à une mutagenèse dirigée mettant en oeuvre l'oligonucléotide décrit dans la SEQ ID NO: 13. La séquence de l'ADNc est modifiée de manière à introduire un site de restriction *HindIII* donnant lieu au vecteur M13TG5824.

On reconstitue la séquence d'ADN codant pour la "version courte" de la séquence pro de la défensine A, débutant à l'acide aminé +6 et se terminant à l'acide aminé +31 de la SEQ ID NO: 2, ceci en mettant en oeuvre deux oligonucléotides synthétiques décrits dans les SEQ ID NO: 14 et 15. Une fois réassemblés, ces oligonucléotides forment un fragment *NheI*-*AflII*. Le fragment synthétique inclut la jonction avec la séquence pré MF α 1 ainsi que la jonction avec la séquence codant pour la défensine A mature.

Le fragment synthétique *NheI*-*AflII* ainsi que le fragment *AflII*-*SaI* isolé de M13TG5824 sont liés avec le vecteur pTG5896 digéré par les enzymes *NheI* et *SaI*. On transforme le mélange de ligation dans la souche *E. coli* 1106. On identifie un clone présentant un digest de restriction correct qui est désigné pTG5897. Le vecteur pTG5897 contient donc un bloc d'expression comprenant la protéine de fusion composée de la séquence pré MF α 1, la séquence pro version courte du précurseur de la défensine A (acides aminés +6 à +31) et la défensine A mature, placée sous le contrôle du promoteur modifié du gène MF α 1.

Ledit bloc d'expression est isolé de pTG5897 sous la forme d'un fragment *SphI*-*SaI*. On introduit ledit fragment dans le vecteur M13TG3868 digéré par les enzymes *SphI* et *SaI*, générant ainsi le vecteur M13TG6801.

Le vecteur M13TG6801 est soumis à une mutagenèse dirigée afin de générer la "version longue" (acides aminés +1 à +31) de la séquence pro du précurseur de la défensine A, en mettant en oeuvre l'oligonucléotide décrit dans la SEQ ID NO: 16. Parallèlement au cours de la même réaction, on a également modifié la séquence correspondant à la jonction entre la séquence pro du précurseur de la défensine A et la séquence mature de la défensine A. On y a introduit 5 codons comprenant un site *AccI* et codant pour les 5 acides aminés N-terminaux de rHV2-Lys⁴⁷, ceci en mettant en oeuvre l'oligonucléotide décrit dans la SEQ ID NO: 17. Le vecteur M13TG6806 ainsi généré, code pour la séquence pré MF α 1, la séquence pro du précurseur de la défensine

A (acides aminés +1 à +31), le peptide Ile-Thr-Tyr-Thr-Asp et la défensine A mature.

On isole du vecteur M13TG3868, un fragment *AccI*-*SaI* comportant la séquence codant pour rHV2-Lys⁴⁷ déletée des 5 paires de bases (pb) codant en partie pour le peptide Ile-Thr N-terminal. Le fragment est introduit dans le vecteur M13TG6806 digéré par *AccI* et *SaI*, donnant lieu à M13TG6807, qui contient le promoteur modifié du gène MF α 1 précédant la protéine de fusion suivante : séquence pré MF α 1, séquence pro du précurseur de la défensine A (acides aminés +1 à +31) et séquence du variant rHV2-Lys⁴⁷ de l'hirudine.

Ce bloc d'expression est isolé de M13TG6807 sous la forme d'un fragment *SphI*-*SaI*. Le fragment est inséré dans le vecteur d'expression de la levure pTG3828 digéré par les enzymes *SphI* et *SaI*, donnant lieu au vecteur pTG6823.

Parallèlement, le fragment *SphI*-*SaI* isolé de M13TG6807 est introduit entre les sites *SphI* et *SaI* du vecteur pTG4812. Le vecteur pTG4812 est dérivé du vecteur pTG3828, dans lequel on a introduit une copie du gène KEX2 de levure, ceci au niveau de la jonction de la partie 2 μ et de la partie pBR322 du vecteur. On transforme le mélange de ligation dans la souche *E. coli* NM522 et on identifie un clone présentant un profil de digestion correct. Le vecteur pTG6824 ainsi généré, comprend la même cassette d'expression de rHV2-Lys⁴⁷ que pTG6823 ainsi qu'une copie du gène KEX2 insérée en dehors de ladite cassette d'expression.

On transforme les vecteurs d'expression pTG6823 et pTG6824 dans la souche *S. cerevisiae* TGY47.1 (MAT α , pra1, prb1, prc1, cps1, ura3-delta5, leu2-3, leu2-112, his) ou dans la souche TGY48.1 qui dérive de la souche TGY47.1, mais présente une prototrophie pour la leucine (Leu+). Les cellules de levure sont transformées selon la technique standard de l'acétate de lithium (Ito et al., J. Bacteriol., 1983, 133). D'autres protocoles de transformation de la levure peuvent également être employés. Des transformants prototrophes Ura+ sont sélectionnés sur milieu minimum (0,67% de bases azotées pour levure YNB (Yeast Nitrogen Base) sans acide aminé, 1% de casamino acides, 2% de glucose et 2% de bacto agar). On vérifie la stabilité du phénotype Ura+ sur boîte d'agar en milieu sélectif contenant le milieu décrit ci-dessus.

Des transformants TGY47.1/pTG6823 et TGY47.1/pTG6824 sont mis en culture en erlenmeyer à 28°C dans un milieu sélectif (0,67% de YNB sans acide aminé, 1% de casamino acides et 2% de glucose). Après 48h de culture, on sépare cellules et surnageants par filtration d'un aliquote de la culture sur membrane 0,22 μ . Une fraction du surnageant est soumise à une HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) analytique en phase inverse dans les conditions décrites dans Achstetter et al. (Gene, 1992, 110, 25-31). On mesure l'absorbance de l'effluent à 205nm. Les profils de chromatographie obtenus pour les effluents issus de la culture TGY47.1/pTG6823 et TGY47.1/pTG6824 sont montrés dans les Figures 2A et 2B, respectivement.

On soumet le matériel élué de la colonne et présentant un temps de rétention d'environ 10,25min à un séquençage des acides aminés N-terminaux. Le matériel dérivé de la culture TGY47.1/pTG6823 montre un profil de chromatographie hétérogène dans lequel deux types de séquences N-terminales sont lues en quantité à peu près équivalente :

(1) la séquence décrite dans la SEQ ID NO: 18 où Xaa représente les acides aminés qui n'ont pas pu être identifiés clairement. Cette séquence correspond à la séquence N-terminale attendue pour le variant mature rHV2-Lys⁴⁷ et,

(2) la séquence décrite dans la SEQ ID NO: 19 où Xaa représente les acides aminés qui n'ont pas pu être identifiés clairement. Ladite séquence correspond à la séquence N-terminale du rHV2-Lys⁴⁷ comprenant en outre une extension N-terminale de trois acides aminés provenant de la séquence pro du précurseur de la défensine A d'insecte.

Par contre, avec le matériel provenant de la culture TGY47.1/pTG6824, on obtient un pic homogène et unique qui donne lieu à la séquence en acides aminés décrite dans la SEQ ID NO: 20, correspondant à la séquence N-terminale du rHV2-Lys⁴⁷ mature (Xaa représente les acides aminés qui n'ont pas pu être identifiés clairement). Ainsi, la coexpression du gène KEX2 produit une protéine hétérologue mature et homogène.

De plus, on détermine l'activité inhibitrice du variant rHV2-Lys⁴⁷ secrété vis à vis de la thrombine, en utilisant un test colorimétrique (activité protéolytique sur un substrat synthétique, le chromozyme TH, Boehringer Mannheim). Le tableau 1 présente les résultats des dosages. L'activité du rHV2-Lys⁴⁷ est exprimé en ATU/A_{600nm} (1-2 x 10⁷ cellules/ml correspondent à 1 unité A_{600nm}).

Tableau 1

Plasmides	KEX2	rHV2-Lys ⁴⁷ (ATU/A _{600nm})
pTG6823	-	8,6
pTG6824	+	25,6

On peut voir que la présence du gène KEX2 dans le plasmide pTG6824 permet une augmentation d'un

facteur 3 de la production de rHV2-Lys⁴⁷ sous forme active.

EXEMPLE 2 : construction des vecteurs pTG8835 et pTG8836 et production de rHV2-Lys⁴⁷ dans le milieu de culture d'une souche de levure transformée par lesdits vecteurs.

Le vecteur M13TG6807 est soumis à une mutagenèse dirigée afin de remplacer le résidu alanine en position +9 de la séquence pro "version longue" de la défensine A par un résidu thréonine, en mettant en oeuvre l'oligonucléotide décrit dans la SEQ ID NO: 21. Le phage muté est vérifié par séquençage et donne lieu au M13TG8832.

La cassette d'expression comportant le promoteur modifié du gène MF α 1 dirigeant l'expression de la séquence codant pour la séquence pré MF α 1, la séquence pro "version longue" (Ala⁹ -> Thr) du précurseur de la défensine A de *Phormia terranova* et rHV2-Lys⁴⁷ mature, est isolée de M13TG8832 sous la forme d'un fragment *Sph*I-*Sal*I. Le fragment purifié est inséré dans le vecteur pTG3828 digéré par les enzymes *Sph*I et *Sal*I, donnant lieu au vecteur pTG8835.

Parallèlement, le fragment *Sph*I-*Sal*I purifié de M13TG8832 est également cloné entre les sites *Sph*I et *Sal*I du vecteur pTG4812, lequel contient une copie du gène KEX2 de levure.

On transforme les plasmides pTG8835 et pTG8836 dans les cellules de levure et on analyse les transformants obtenus selon le protocole décrit précédemment.

Les profils chromatographiques obtenus sont présentés dans les Figures 3A et 3B, correspondant respectivement aux effluents issus de la culture TGY47.1/pTG8835 et TGY47.1/pTG8836. Les résultats des dosages de l'activité antithrombine sont présentés dans le tableau 2

Tableau 2		
Plasmides	KEX2	rHV2-Lys ⁴⁷ (ATU/A _{600nm})
pTG8835	-	10,4
pTG8836	+	25,6

On peut constater que la présence du gène KEX2 dans la construction selon l'invention (pTG8836) réduit le nombre de pics générés lors de l'analyse des surnageants de culture par chromatographie et améliore la production de rHV2-Lys⁴⁷ active d'un facteur 2,5 fois. Par contre, la mutation de l'alanine en position +9 de la séquence pro du précurseur de la défensine A d'insecte en thréonine, ne produit qu'un effet mineur sur la qualité et la quantité de rHV2-Lys⁴⁷ produit.

EXEMPLE 3 : construction des vecteurs pTG8840 et pTG8843 et production de l'Ala-Pro-trophoblastine ovine dans le milieu de culture d'une souche de levure transformée par lesdits vecteurs.

Le vecteur M13TG7720 (Degryse et al, Gene, 1992, 118, 47-53) est digéré par les enzymes *Hind*III et *Eco*RI puis traité par le grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli*. Le fragment de 0,5kb résultant de ce traitement, est purifié sur gel d'agarose et inséré dans le vecteur M13TG6807, préalablement digéré par *Acc*I et traité par le grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli*. On transforme le mélange de ligation dans la souche *E. coli* NM522 et on identifie un phage ayant incorporé le fragment de 0,5kb. Le clone est désigné M13TG8818.

Le vecteur M13TG8818 est soumis à une mutagenèse dirigée afin d'introduire en amont de la séquence codant pour l'extrémité N-terminale de la trophoblastine ovine, une séquence codant pour le dipeptide Ala-Pro, en mettant en oeuvre l'oligonucléotide décrit dans la SEQ ID NO: 22. Après mutagenèse, la séquence des clones générés est vérifiée. On choisit un clone contenant la mutation désirée, désigné M13TG8834.

Le vecteur M13TG8834 est à son tour modifié par mutagenèse dirigée, mettant en oeuvre l'oligonucléotide décrit dans la SEQ ID NO: 23. La mutagenèse permet de générer une jonction correcte entre les séquences codantes pour l'extrémité 3' de la séquence pro du précurseur de la défensine A de *Phormia terranova* et la protéine hétérologue Ala-Pro-trophoblastine. On identifie un clone muté par séquençage, donnant lieu au vecteur M13TG8838. Ce dernier contient une cassette d'expression composée de la version modifiée du promoteur du gène MF α 1 en amont de la séquence codant pour une protéine de fusion composée de la séquence pré MF α 1, la séquence pro du précurseur de la défensine A de *Phormia terranova* (31 acides aminés) et l'Ala-Pro-trophoblastine.

On digère le vecteur M13TG8838 par l'enzyme *Eco*RI et on le traite par le grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli*. Le fragment ainsi généré, contenant la cassette d'expression décrite ci-dessus, est purifié

et inséré dans le vecteur pTG3828 linéarisé par *Sma*I. On identifie un transformant ayant intégré la cassette d'expression dans l'orientation correcte par rapport au terminateur PGK. La construction est désignée pTG8840.

Parallèlement, le fragment *Eco*RI traité de manière à avoir les extrémités franches et isolé de M13TG8838, est également inséré dans le vecteur pTG4812 linéarisé par *Sma*I. On identifie par analyse de restriction, un clone présentant la cassette d'expression dans l'orientation correcte vis à vis du terminateur PGK. Le clone est appelé pTG8843.

On transforme les vecteurs d'expression pTG8840 et pTG8843 dans la souche de levure TGY47.1, selon la méthode décrite précédemment.

Des transformants de chaque type sont mis en culture en erlenmeyer à 28°C dans un milieu sélectif (0,67% de YNB sans acide aminé, 1% de casamino acides et 2% de glucose). Après 48h de culture, on sépare les cellules et surnageants par filtration d'une fraction de la culture sur membrane 0,22µ. Le surnageant obtenu est concentré par ultrafiltration (Centricon YM5, seuil de coupure 5kDa). On soumet un aliquote du filtrat obtenu à une électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE). L'échantillon est chauffé à 95°C pendant 5min avant d'être chargé sur un gel de polyacrylamide 12,5%. Après migration, le gel est coloré par le bleu de Coomassie pour visualiser l'ensemble des protéines (Figure 4). Dans le matériel provenant des levures transformées par les vecteurs pTG8840 et pTG8843, on visualise un doublet de bandes, l'une à 15kDa et l'autre présentant une mobilité électrophorétique légèrement supérieure. De plus, on détecte également d'autres bandes présentant une mobilité électrophorétique inférieure, qui ne sont pas non plus présentes dans l'échantillon correspondant au contrôle négatif. L'ensemble des bandes spécifiquement détectées dans les échantillons pTG8840 et pTG8843, est en outre révélé en Western blot par un antisérum de lapin anti-trophoblastine ovine. Le matériel de mobilité électrophorétique plus élevée peut être dû à des produits de dégradation de la trophoblastine ou à un artéfact d'électrophorèse. Par contre, le matériel de mobilité électrophorétique inférieure, reconnu par les anticorps de lapin anti-trophoblastine ovine, peut être dû à des agrégats protéiques qui peuvent se former malgré le traitement des échantillons à 95°C.

Les bandes formant un doublet à environ 15 à 18 kDa sont transférées sur une membrane PVDF (polyvinylidène difluoride). On soumet le matériel transféré à une analyse de la séquence en acides aminés N-terminaux. On obtient une seule séquence en acides aminés décrite dans la SEQ ID NO: 24, qui correspond à la séquence attendue pour une protéine hétérologue Ala-Pro-trophoblastine et où Xaa représente les acides aminés qui n'ont pu être identifiés clairement.

EXEMPLE 4 : vecteurs d'expression de rHV2-Lys⁴⁷ dans lesquels la séquence pro de la défensine A comprend un résidu cystéine en position 2, 6, 9 ou 17.

Le vecteur M13TG6807 est soumis à une mutagenèse dirigée afin de remplacer le résidu proline en position +2 ou l'un des résidus alanine en position +6, +9 ou +17 par un résidu cystéine. On met en oeuvre les oligonucléotides mutagènes décrits respectivement dans les SEQ ID NO: 25 à 28. On obtient les vecteurs M13TG9836, M13TG9838, M13TG9839 et M13TG9840.

Un fragment *Sph*I-*Sal*I de 1,4 kb est isolé de chacun des vecteurs précédents avant d'être inséré soit dans le vecteur pTG3828 ou pTG4812 également digéré par *Sph*I et *Sal*I. On transforme les vecteurs obtenus dans les cellules de levure et on évalue l'activité antithrombine dans les surnageants de culture comme indiqué précédemment.

L'activité antitrombine de la rHV2Lys⁴⁷ sécrétée des constructions mettant en oeuvre les variants Cys⁺², Cys⁺⁶, Cys⁺⁹ et Cys⁺¹⁷ de la séquence pro défensine A est comparable à celle obtenue avec la séquence pro de type sauvage.

Comme précédemment, on observe une production de rHV2-Lys⁴⁷ active améliorée d'un facteur 2,5 à 3 fois dans les constructions dérivées de pTG4812 qui incluent le gène KEX2.

EXEMPLE 5 : construction de vecteurs comprenant la séquence pré BGL2, la séquence pro de la défensine A dans laquelle le résidu arginine en position 28 est remplacé par un résidu proline (Arg²⁸ -> Pro) et la séquence codante pour rHV2-Lys⁴⁷, sous le contrôle du promoteur modifié du gène MFα1.

On isole un fragment *Pst*I de M13TG4815. Celui-ci comprend le promoteur MFα1 modifié mais incluant en outre un site *Xho*I en position -12 par rapport à l'ATG initiateur (*Xho*I-12) suivi de la séquence pré BGL2, de la séquence pro MFα1 et de la séquence synthétique codant pour la défensine A de *Phormia terranova*. La séquence pré BGL2 est décrite dans Klebl et Tanner, (J. Bacteriol., 1989, 171, 6259-6264). Ce fragment *Pst*I de 768pb qui porte le promoteur MFα1 tel que décrit ci-dessus ainsi que les 8 premiers acides aminés de la séquence pré BGL2, est sous cloné dans le vecteur M13TG4813 digéré par *Pst*I. Il en résulte M13TG5871.

On isole le fragment *SphI*-*Bam*HI de M13TG5871 comprenant le promoteur MF α 1 (*Xho*I-12), une séquence pré de fusion composée des résidus 1 à 8 de la séquence pré BGL2 et des résidus 8 à 18 de la séquence MF α 1, la séquence pro MF α 1 et le gène synthétique défensine A. Ce fragment est introduit dans pTG3828 également traité par les enzymes *SphI* et *Bam*HI pour donner pTG5885.

Par ailleurs, le vecteur M13TG6801, déjà mentionné, est soumis à une mutagenèse dirigée afin de générer la version longue (acides aminés +1 à +31) de la séquence pro de la défensine A à l'aide de l'oligonucléotide OTG3051 (SEQ ID NO: 29). Par la même occasion, on introduit un site *Nhe*I en 3' de la séquence pré MF α 1. On obtient pTG6820. On introduit le fragment *SphI*-*Bam*HI purifié de pTG6820 entre les mêmes sites de pTG3828, pour générer pTG6821.

pTG5885 est digéré par les enzymes *Xho*I et *Sal*I puis ligé en présence de deux fragments, l'un *Xho*I-*Nhe*I provenant de la rehybridation des oligonucléotides synthétiques OTG3070 et OTG3071 (SEQ ID NO: 30 et 31) et l'autre *Nhe*I-*Sal*I isolé de pTG6821 et correspondant à l'extrémité 3' de la séquence pré de la défensine A, la séquence pro (version longue) et la séquence de la défensine A mature. On obtient pTG6880.

D'autre part, le vecteur pTG3828 est digéré partiellement par *Xba*I, traité par le grand fragment Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli* avant d'être reliqué, donnant lieu à pTG6888 dans lequel le site *Xba*I situé dans le 2 μ est détruit. Celui-ci est digéré par *SphI* et *Bam*HI, sites entre lesquels on introduit le fragment *SphI*-*Bam*HI isolé de M13TG8883. Ce dernier comprend une cassette d'expression composée du promoteur modifié du gène MF α 1, dirigeant l'expression d'un précurseur "séquence pré BGL-2, séquence pro MF α 1, séquence codant pour la protéine mature OspA" (Bergstrom et al., Mol Microbiol., 1989, 3, 479-486). On obtient pTG8890.

On amplifie par PCR à partir de la matrice pTG8890 et des amorces OTG4442 et OTG4443 (SEQ ID NO: 32 et 33) un fragment portant le promoteur modifié du gène MF α 1 suivi de la séquence pré BGL2.

Parallèlement on amplifie, également par PCR, un fragment comportant la séquence pro de la défensine A à partir de pTG6880 et des amorces OTG4444 (SEQ ID NO: 34) et OTG4445 (SEQ ID NO: 35). Les amorces permettent d'introduire également des mutations silencieuses pour générer un site *Eag*I près de l'extrémité 3' de la séquence pro et un site *Kpn*I au delà de cette extrémité. Puis on assemble les deux fragments PCR pour former un fragment linéaire *SphI*-*Kpn*I par un double PCR à l'aide des oligonucléotides OTG4442 (SEQ ID NO: 32) et OTG 4445 (SEQ ID NO: 35). Il est inséré dans le vecteur M13TG131 également traité par *SphI* et *Kpn*I pour donner M13TG8898.

On soumet celui-ci à une mutagenèse dirigée pour corriger une mutation A \rightarrow G en position -5 par rapport à l'ATG initiateur. On met en oeuvre l'oligonucléotide OTG4637 (SEQ ID NO: 36) pour générer M13TG9800.

On isole par PCR la séquence codante pour rHV2-Lys⁴⁷, munie d'une extension N-terminale correspondant aux derniers acides aminés de la séquence pro de la défensine A, dont les codons codant pour les résidus en position 27 et 28 ont été modifiés silencieusement de manière à introduire un site de restriction *Eag*I. D'autre part, on introduit en 3' du codon stop de rHV2-Lys⁴⁷ un site *Sal*I. On utilise à titre de matrice le vecteur M13TG6807 et les deux amorces OTG5074 et OTG5075 reportées dans les SEQ ID NO: 37 et 38.

On introduit le fragment *Eag*I-*Sal*I généré par PCR entre les mêmes sites de M13TG 9800. On obtient M13TG9853 lequel est digéré par *Sal*I puis traité par le grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli*, avant d'être reliqué sur lui-même (destruction du site *Sal*I). On génère M13TG9854.

Ce dernier est clivé par *Eag*I et *Acc*I puis ligué à un adaptateur constitué des 2 oligonucléotides OTG5136 et OTG5137 rehybridés (SEQ ID NO: 39 et 40). Après transformation du mélange de ligation dans *E. coli*, on isole quelques clones dont on vérifie la séquence par les techniques standards. On sélectionne un clone dont la séquence est correcte, désigné ci-après M13TG9856.

On isole le fragment *SphI*-*Bgl*II de 1,4 kb de M13TG9856 lequel est inséré entre les sites *SphI* et *Bgl*II de pTG3828 ou *SphI* et *Bam*HI de pTG4812, pour donner respectivement pTG9860 et pTG9863.

Comme précédemment, après transformation de ces 2 vecteurs d'expression dans la souche de levure TGY47.1, on détermine l'activité antithrombine de l'hirudine rHV2-Lys⁴⁷ sécrétée dans le surnageant des cultures correspondantes. L'activité mesurée à partir des constructions comprenant la séquence pro (Arg²⁸ -> Pro) de la défensine A est comparable à celle obtenue avec les vecteurs incluant une séquence pro de type sauvage. On observe également une amélioration d'un facteur 3 lorsque le vecteur inclut le gène KEX2 (pTG9863 versus pTG9860).

EXEMPLE 6 : construction du vecteur pTG8709 et production de la xénoxine-1 dans le milieu de culture d'une souche de levure transformée par ledit vecteur.

On amplifie par PCR la séquence codant pour la xénoxine-1 mature munie d'un site *Eag*I en 5' et d'un site *Sal*I en 3'. On utilise à titre de matrice M13TG4414 ou pTG4414 (Kolbe et al., J. Biol. Chem., 1993, 268, 16458-16464) et les amorces OTG5770 et OTG5771 (SEQ ID NO: 41 et 42). Le fragment ainsi généré est in-

tégré dans M13TG9800 préalablement digéré par *EagI* et *SaII* pour donner M13TG8703. Celui-ci comprend une cassette d'expression composée du promoteur MF α 1 modifié dirigeant l'expression d'un précurseur "séquence pré BGL2, séquence pro MF α 1, séquence codant pour la xénoxine-1 mature". La séquence en acide aminé de cette dernière est indiquée dans la SEQ ID NO: 43.

5 On introduit le fragment *SphI*-*SaII* isolé de M13TG8703 et portant la cassette d'expression entre les mêmes sites de pTG4812. On obtient pTG8709 qui est transformé dans la souche *S. cerevisiae* TGY73.4 laquelle dérive de TGY47.1 mais présente une prototrophie pour la leucine (Leu⁺). On sélectionne un transformant Ura⁺ que l'on fait pousser en milieu sélectif (décrit dans l'exemple 1) pendant 60 heures. Le surnageant de culture est concentré par ultrafiltration sur membrane YM2 et centrifugation selon les techniques conventionnelles. Le concentré est soumis à une électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (15,3 % en polyacrylamide). Les protéines sont transférées sur membrane PVDF et le matériel correspondant au poids moléculaire attendu (environ 7kDa) est soumis à un séquençage des acides aminés N-terminaux. On lit une séquence, présente en quantité majoritaire, qui correspond à la séquence N-terminale attendue pour la xénoxine-1 mature ; (SEQ ID NO: 44 ; Xaa représente les acides aminés qui n'ont pas pu être identifiés clairement).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

LISTE DE SEQUENCES

5

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: Transgene S.A.
 (B) RUE: 11 rue de Molsheim
 (C) VILLE: Strasbourg
 (E) PAYS: France
 (F) CODE POSTAL: 67000
 (G) TELEPHONE: (33) 88 27 91 00
 (H) TELECOPIE: (33) 88 22 58 07

15

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Nouvelle sequence pro permettant la
 secretion de proteines heterologues a partir d'une cellule de
 levure.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 44

20

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

25

(vi) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:

- (A) NUMERO DE DEPOT: FR 90 00171
 (B) DATE DE DEPOT: 11-JAN-1993

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

30

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 31 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire

35

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

40

(v) TYPE DU FRAGMENT: interne

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: sequence pro de la defensine A
 (B) SOUCHE: Phormia terranovae

45

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Ile Xaa Ala Asp Ala Xaa Asn Asp Xaa His Phe Val Asp Gly Val Gln
 1 5 10 15

50

Xaa Leu Lys Glu Ile Glu Pro Glu Leu His Gly Xaa Tyr Xaa Arg
 20 25 30

55

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 31 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
- 10 (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (v) TYPE DU FRAGMENT: interne
- 15 (vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: sequence pro de la defensine A de Phormia
 terranovae
 (B) SOUCHE: Phormia terranovae
- 20 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Pro | Ala | Asp | Ala | Ala | Asn | Asp | Ala | His | Phe | Val | Asp | Gly | Val | Gln |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Ala | Leu | Lys | Glu | Ile | Glu | Pro | Glu | Leu | His | Gly | Arg | Tyr | Lys | Arg | |
| 25 | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

- 30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 41 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- 35 (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
 (B) SOUCHE: Phormia terranovae
 (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de reconstitution du
 gene defensine A

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

45 AGCTTGACAGAGAGCTAC CTGTGACTTG TTGTCCGGTA C

41

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

- 50 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple

55

(D) CONFIGURATION: linéaire

5 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

10 (vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: Phormia terranova

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de reconstitution du
gene defensine A

15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

ACAGGTAGCT CTCTTGTCCTA 20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 13 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

25 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

30 (vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: Phormia terranova

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de reconstitution du
gene defensine A

35 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CGGACAACAA GTC 13

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

40 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 40 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

45 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

50 (vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: Phormia terranova

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de reconstitution du

55

gene defensine A

5 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CGGTATTAAC CACTCCGCTT GTGCTGCTCA CTGTTTGTG

40

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

15 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

20 (vi) ORIGINE:

- (B) SOUCHE: Phormia terranova
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de reconstitution du gene defensine A

25 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

AGCACAAGCG GAGTGGTTAA TACCGGTAC

29

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 38 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

40 (vi) ORIGINE:

- (B) SOUCHE: Phormia terranova
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de reconstitution du gene defensine A

45 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

AGAGGTAACA GAGGTGGCTA CTGTACGGT AAGGGTGT

38

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

50 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 37 paires de bases

55

(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

5

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

10

(vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: Phormia terranovae

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de reconstitution du
gene defensine A

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

AGTAGCCACC TCTGTTACCT CTCAACAAAC AGTGAGC

37

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

20

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 26 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

25

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

30

(vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: Phormia terranovae

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de reconstitution du
gene defensine A

35

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

TTGTGTTTGT AGAACTAAG GATCCG

26

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

40

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 46 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

45

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

50

(vi) ORIGINE:

55

- (B) SOUCHE: *Phormia terranovae*
 (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de reconstitution du
 gene defensine A

5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

AATTCGGATC CTTAGTTTCT ACAAACACAA ACACCCTTAC CGTTAC

46

10 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 37 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

15 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

20 (iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de mutagenese

25 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

TCGCAGCATC CTCGCGCTA GCTGCTCCAG TCAACAC

37

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 36 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

40 (vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de mutagenese

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

45 ATGTTGCTCT CTTGTCAAAG CTTTGTAAATC CTTGGC

36

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 88 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

50

55

(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- 5 (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
- 10 (B) SOUCHE: Phormia terranovae
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de reconstitution de la sequence pro courte

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

15 CTAGCTGCCA ACGATGCACA TTTTGTGAT GCGGTCAGG CTTTAAAAGA AATTGAACCC 60

GAATTACATG GCCGTTACAA GAGAGCAA 98

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15:

- 20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 88 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- 25 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- 30 (vi) ORIGINE:
- (B) SOUCHE: Phormia terranovae
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de reconstitution de la sequence pro courte

35 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

CATGTTGCTC TCTTGTAACG GCCATGTAAT TCGGGTTCAA TTTCTTTTAA AGCCTGAACG 60

40 CCATCAACAA AATGTGCATC GTTGGCAG 88

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 16:

- 45 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 45 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- 50 (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON

55

(vi) ORIGINE:
 (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de mutagenese

5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

TCCTCCGCGC TAGCTATTCC TGCTGATGCT GCCAACGATG CACAT

45

10

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 45 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

15

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

20

(vi) ORIGINE:
 (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de mutagenese

25

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

GGCCGTTACA AGAGAATTAC GTATACAGAC GCAACATGTG ATTTA

45

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 11 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire

30

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

35

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: N-terminal

(vi) ORIGINE:
 (C) INDIVIDUEL ISOLE: sequencage N-term du materiel
 TGY47.1/pTG6823

40

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

45

Ile Thr Tyr Thr Xaa Xaa Thr Glu Ser Gly Gln
 1 5 10

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 11 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé

50

55

(D) CONFIGURATION: linéaire

5 (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: N-terminal

10 (vi) ORIGINE:
(C) INDIVIDUEL ISOLE: sequencage du materiel de la culture
TGY47.1/PTG6823

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

15 Tyr Xaa Xaa Ile Thr Tyr Thr Asp Xaa Thr Glu
1 5 10

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 20:

20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 15 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(D) CONFIGURATION: linéaire

25 (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: N-terminal

30 (vi) ORIGINE:
(C) INDIVIDUEL ISOLE: sequencage du materiel de la culture
TGY47.1/PTG6824

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

35 Ile Thr Tyr Thr Asp Xaa Thr Glu Ser Gly Gln Asn Leu Xaa Leu
1 5 10 15

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 21:

40 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 33 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

45 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

50 (vi) ORIGINE:
(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de mutagenese

55

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

GATGCTGCCA ACGATACACA TTTTGTGAT GGC

33

5

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 22:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 39 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

10

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

15

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de mutagenese

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

GTTACAAGAG AATTACGTGC TCCATGTTAC CTATCTCAG

39

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 23:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 36 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

30

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

35

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de mutagenese

40

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

CATGGCCGTT ACAAGAGAGC TCCATGTTAC CTATCT

36

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 24:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 13 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

45

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

50

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

55

(v) TYPE DU FRAGMENT: N-terminal

5 (vi) ORIGINE:
 (C) INDIVIDUEL ISOLE: sequencage du materiel de la culture
 TGY47.1/pTG8840

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:

10 Ala Pro Xaa Tyr Leu Ser Gln Arg Leu Met Leu Asp Ala
 1 5 10

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 25:

15 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

20 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

25 (vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: OTG4864
 (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de mutagenese (pro
 def A Pro2 -> Cys)

30 (vii) SOURCE IMMEDIATE:
 (B) CLONE: M13TG9836

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:

35 TCCGCGCTAG CTATTTGTGC TGATGCTGCC AA 32

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 26:

40 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

45 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: OTG4865
 50 (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de mutagenese (sequ
 pro def A Ala6 -> Cys)

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

55

(B) CLONE: M13TG9838

5 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26:

ATTCTGCTG ATGCTCTTAA CGATGCACAT TT

32

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 27:

10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

15 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

20 (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: OTG4866
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de mutagenese
(sequence pro def A Ala9->Cys)

25 (vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: M13TG9839

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 27:

GATGCTGCCA ACGATTGTCA TTTTGTGAT GGC

33

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 28:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

35

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

40

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: OTG4867
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de mutagenese (sequ
pro def A Ala17 -> Cys)

45

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: M13TG9840

50

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 28:

55

GTTGATGGCG TTCAGTGTTC AAAAGAAATT GAA

33

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 29:

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 45 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- 10 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- 15 (vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: OTG3051
 (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de mutagenese

20 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 29:

TCCTCCGCGC TAGCTATTCC TGCTGATGCT GCCAACGATG CACAT

45

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 30:

- 25 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 75 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- 30 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- 35 (vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: OTG3070
 (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide

40 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 30:

TCGAGTAAAA GAATGAAATT CTTTCATGGTA TTCGTTGTTA CTTTCTGCTT AGCAGTTTGT

60

TTTGTCTCCC AATCG

75

45 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 31:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 75 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- 50 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

55

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

5 (iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: OTG3071
 (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide

10 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 31:

CTAGCGATTG GGAGACAAAA CAACTGCTA AGCAGAAAGT AACAAACGAAT ACCATGAAGA 60

ATTTCATTCT TTTAC 75

15 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 32:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 36 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 20 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

25 (iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: OTG4442
 (C) INDIVIDUEL ISOLE: amorce PCR d'un fragment "prom
 30 MFalpal-sequ pre BGL2"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 32:

CTCGATATCG CATGCTATTG ATAAGATTTA AAGGTA 36

35 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 33:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 38 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 40 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

45 (iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: OTG4443
 (C) INDIVIDUEL ISOLE: amorce PCR pour un fragment "prom
 50 MFalpal-sequ pre BGL2"

55

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 33:

TGTGCATCGT TGGCAGCATC AGCAGGAATA GCTGAAAC

38

5

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 34:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 59 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

10

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

15

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: OTG4444

(B) SOUCHE: amorce PCR pour isoler sequence pro def A (site EagI)

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 34:

CTATTTTTC AAGCCTCCCA AGTTTCAGCT ATTCCTGCTG ATGCTGCCAA CGATGCACA

59

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 35:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 45 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

30

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

35

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: OTG4445

(B) SOUCHE: amorce PCR pour isoler sequence pro def A (site EagI)

40

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 35:

AAGCTAAGTG GTACCTCTCT TGTAACGGCC GTGTAATTCG GGTTC

45

45

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 36:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 21 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

50

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

55

(D) CONFIGURATION: linéaire

5 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

10 (vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: OTG4637

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de mutagenese
(correction mutation prom MFl)

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

15 (B) CLONE: M13TG9800

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 36:

TAAACGATTA AAAGAATGCG T

21

20 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 37:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 42 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

25 (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

30 (iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: OTG5074

(C) INDIVIDUEL ISOLE: amorce PCR

35

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 37:

GCATGATCCT CGGCCGTTAC AAGAGAATTA CGTATACAGA CT

42

40 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 38:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 43 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

45 (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

50 (iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

55

(A) ORGANISME: OTG5075
(C) INDIVIDUEL ISOLE: amorce PCR

5 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 38:

GATGCTGTGA GTCGACCATT TTTCATTGTA AATATTCTTC TGG

43

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 39:

10

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 22 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

15

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

20

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: OTG5136
(C) INDIVIDUEL ISOLE: adaptateur

25 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 39:

GGCCCATACA AGAGAATTAC GT

22

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 40:

30

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 20 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

35

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

40

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: OTG5137
(C) INDIVIDUEL ISOLE: adaptateur

45 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 40:

ATACGTAATT CTCTTGATG

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 41:

50

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 45 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique

55

(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

5 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

10 (vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: OTG5770

(C) INDIVIDUEL ISOLE: amorce de PCR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 41:

15

TACGTCGGCC GTTACAAGAG ACTGAAATGT GTGAATTTAC AAGCG

45

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 42:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

20

(A) LONGUEUR: 33 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

25

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

30

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: OTG5771

(C) INDIVIDUEL ISOLE: amorce de PCR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 42:

35

AGTTTGTCTGA CTCAAGCATT GCACATGTTT CCT

33

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 43:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

40

(A) LONGUEUR: 66 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

45

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Xenoxine

(B) SOUCHE: Xenopus laevis

50

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: Protein

(B) EMBLEMMENT: 1..61

55

[illegible]

Leu Lys Xaa Val Asn Leu Gln Ala Asn Gly Ile Lys Met Xaa Gln
1 5 10 15

3. Une cassette d'expression selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la séquence pro a une séquence en acides aminés telle que montrée dans la SEQ ID NO: 1, débutant à l'acide aminé en position +1 ou +6 et se terminant à l'acide aminé +31, dans laquelle, ensemble ou séparément, le résidu Xaa en position +2 est un résidu proline ou cystéine, le résidu Xaa en position +6 est un résidu alanine ou cystéine,

le résidu Xaa en position +9 est un résidu alanine cystéine ou thréonine, le résidu Xaa en position +17 est un résidu alanine ou cystéine, le résidu Xaa en position +28 est un résidu arginine ou proline et le résidu Xaa en position +30 est un résidu arginine ou lysine.

- 5 4. Une cassette d'expression selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la séquence pro a la séquence en acides aminés telle que montrée dans la SEQ ID N°: 2.
5. Une cassette d'expression selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le fragment d'ADN comporte une séquence correspondant à celle de l'hirudine.
- 10 6. Une cassette d'expression selon la revendication 5, caractérisée en ce que le fragment d'ADN comporte une séquence correspondant à celle du variant rHV2-Lys⁴⁷ de l'hirudine.
7. Une cassette d'expression selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le fragment d'ADN comporte une séquence correspondant à celle de la trophoblastine ovine comprenant à son extrémité 5' une extension constituée par le dipeptide Ala-Pro.
- 15 8. Une cassette d'expression selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le fragment d'ADN comporte une séquence correspondant à celle d'un peptide de la famille des xénoxines.
- 20 9. Une cassette d'expression selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que ladite cassette d'expression comprend en outre un terminateur de transcription fonctionnel dans la levure.
10. Un vecteur d'expression comprenant une cassette d'expression selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.
- 25 11. Un vecteur d'expression selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une ou plusieurs copies de tout ou partie du gène KEX2.
12. Une souche de levure comprenant une cassette d'expression selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 ou un vecteur d'expression selon la revendication 10 ou 11.
- 30 13. Une souche de levure selon la revendication 12, caractérisée en ce que ladite souche est sélectionnée parmi les levures *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris* et *Kluyveromyces lactis*.
- 35 14. Procédé de préparation d'une protéine hétérologue, selon lequel :
 - on cultive une levure selon la revendication 12 ou 13 dans un milieu approprié et,
 - on récupère la protéine hétérologue dans le milieu de culture sous forme mature.
- 40 15. Protéine obtenue par la mise en oeuvre d'un procédé selon la revendication 14.

45

50

55

Figure 1

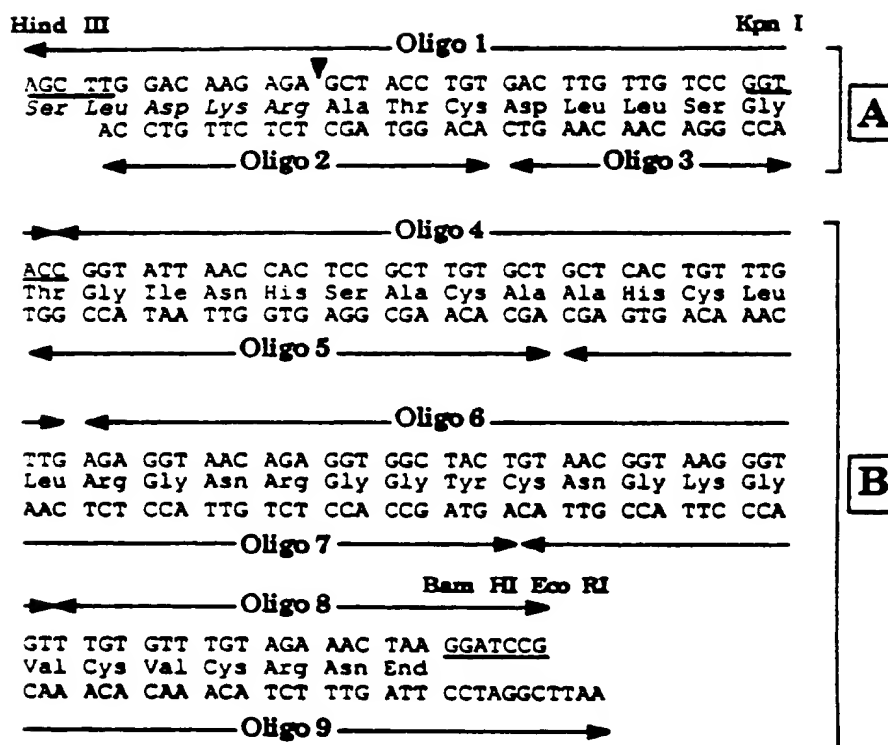


Figure 2

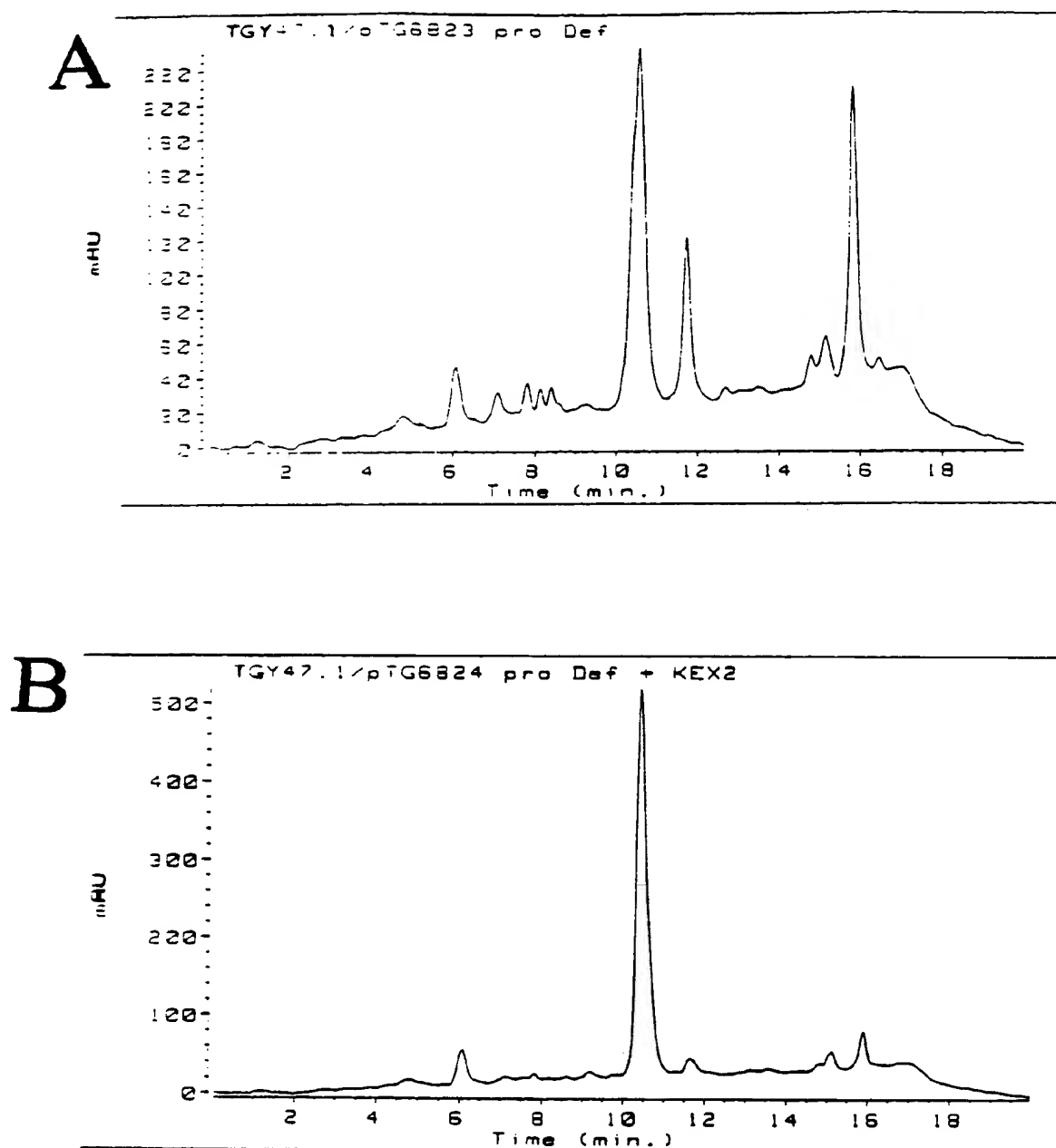


Figure 3

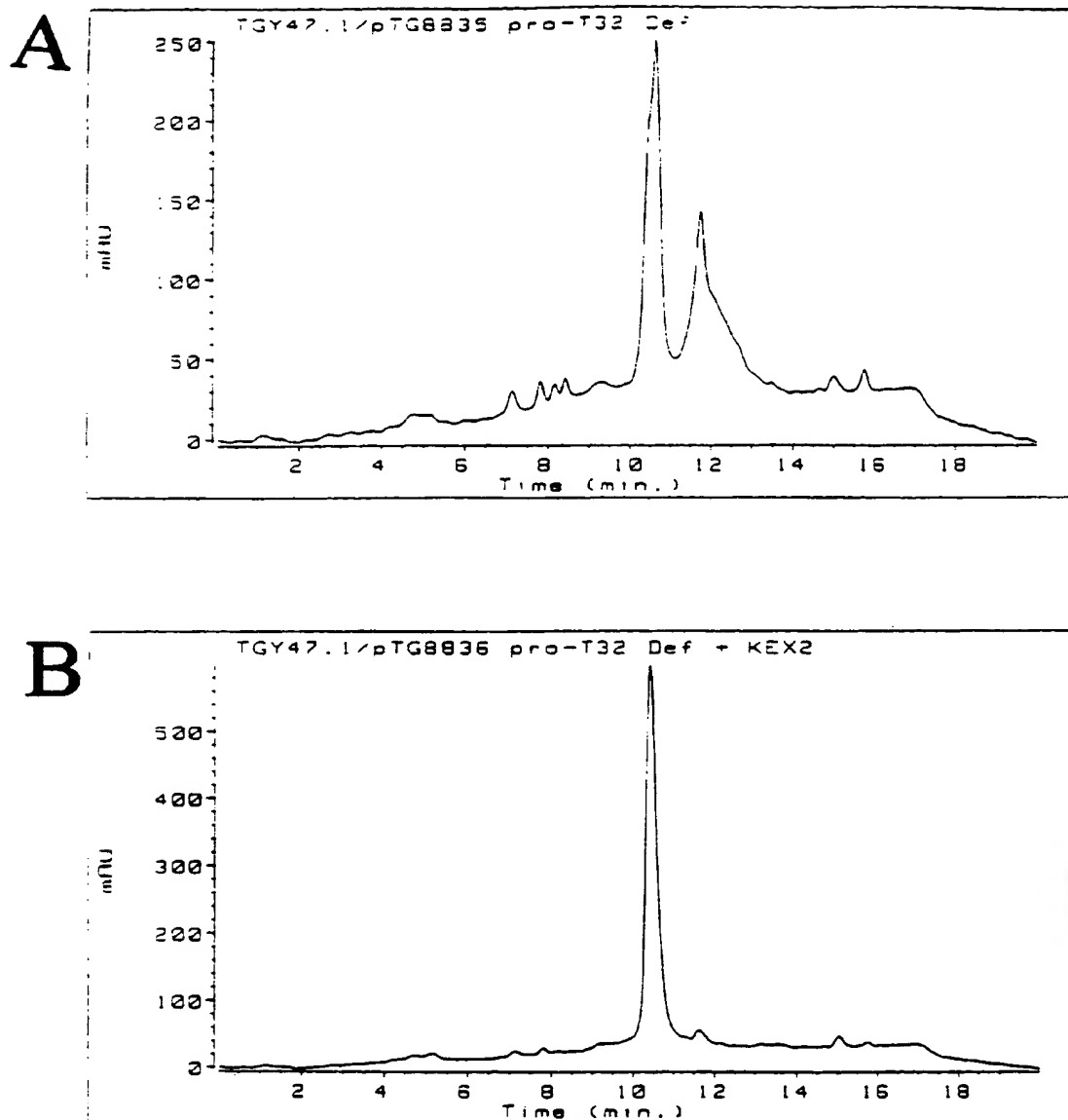
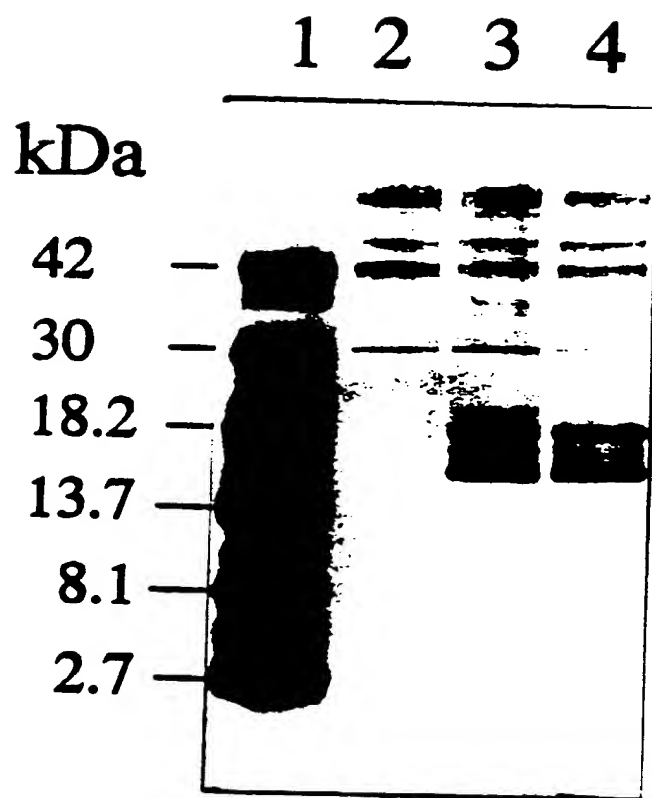


Figure 4





Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande
EP 94 40 0062

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.CLS)
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 81, Août 1984, WASHINGTON US pages 4642 - 4646 A. BRAKE ET AL 'alpha-Factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in Saccharomyces cerevisiae' * le document en entier *	1-15	C12N15/81 C12N15/62 C12N15/15 C12N15/20 C12N15/12 C12N1/15 C07K13/00 //(C12N1/15, C12R1:865), (C12N1/15, C12R1:84), (C12N1/15, C12R1:78)
Y	INVERTEBRATE REPRODUCTION AND DEVELOPMENT vol. 21, no. 1, 1992 pages 15 - 24 J-M REICHART ET AL 'Expression and secretion in yeast of active insect defensin, an inducible antibacterial peptide from the fleshfly Phormia terranova' * le document en entier * *en particulier la discussion*	1-15	
Y	EP-A-0 261 534 (MILES LABORATORIES) 30 Mars 1988 * abrégé * * colonne 2, ligne 23 - colonne 4, ligne 10 *	1-15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CLS) C12N
Y	GENE. vol. 77, 1989, AMSTERDAM NL pages 341 - 348 M. CHARLIER ET AL 'Cloning and expression of cDNA encoding ovine trophoblastin: its identity with a class-II alpha interferon' * le document en entier *	7,9-15	
-/--			
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lien de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 13 Avril 1994	Examineur Van der Schaal, C
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1500 (04/02)



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande
EP 94 40 0062

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.5)
D,P, Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. vol. 268, no. 22, 5 Août 1993, BALTIMORE US pages 16458 - 16464 H. KOLBE ET AL 'Xenoxins, a family of peptides from dorsal gland secretion of Xenopus laevis related to snake venom cytotoxins and neurotoxins' * le document en entier *	8-15	
A	EP-A-0 349 451 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 3 Janvier 1990 * le document en entier *	1-15	
D,A	EMBO JOURNAL. vol. 9, no. 8, 1990, EYNSHAM, OXFORD GB pages 2507 - 2515 J-L DIMARCO ET AL 'Insect immunity: expression of the two major inducible antibacterial peptides, defensin and dipterin, in Phormia terranova' * figure 1 *	1-15	
A	WO-A-90 13646 (TRANSGENE) 15 Novembre 1990 * exemple 3 *	1-15	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 13 Avril 1994	Examineur Van der Schaal, C
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

EPO FORM 1500 03.02 (P0408)